

Invasion de la Nouvelle Calédonie par la tique du bétail *Boophilus microplus* : Interactions avec les bovins et le cerf rusa ; conséquences génétiques et écologiques

Coordinateur : Thierry de MEEUS

Laboratoire *Génétique & Evolution des Maladies Infectieuses*, UMR CNRS - IRD 2724, Campus IRD, 911 avenue d'Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5

Adresse électronique : demeeus@mpl.ird.fr

Tél. : (33) 467 41 63 10 - Fax : (33) 467 41 62 99

Participants

Christine CHEVILLON, Patrick DURAND, Brou Basile KOFFI, Céline ARNATHAU & Dominique JOULIA, sous-équipe SGASS de l'UMR CNRS - IRD 2724

Nicolas BARRE, Michel de GARINE-WICHATITSKY & Sophie DUCORNEZ, Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), Institut Agronomique néo-Calédonien

Mots clés : tique du bétail – adaptation – résistance - génétique des populations - Nouvelle-Calédonie

Summary

The cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* has been a successful invader in many tropical agrosystems. Our study was aimed at investigating the mechanisms involved in these invasive successes through a focus on the situation of New Caledonia Island. Australian cattle ticks were accidentally introduced there in 1942. Since then, it has invaded all *Bos taurus* herds in this island, and has developed resistance there to any acaricide used in tick-control. *R. microplus* has also been found exploiting the rusa deer (*Cervus timorensis russa*), an invasive mammal introduced for game hunting in 1870. Initially a bad host for *R. microplus*, the rusa deer is very abundant and acaricide-free.

We investigated the population genetics of *R. microplus* to evaluate its population sizes and dispersal capacities and to investigate the relative importance of its main host-species (*B. taurus*) and of the invasive dynamics of the rusa deer in its evolution. We studied the variation of polymorphic neutral (non-coding) DNA markers (microsatellites) within individual ticks, between individuals within individual-hosts, within and between bovine herds. We also compared the genetic differentiation between sympatric ticks exploiting either *B. taurus* or *C. timorensis russa*.

In bovine cattle, we showed that the pertinent population scale of *R. microplus* was not the individual-host but the herd it belongs to, the tick dispersal range was restricted to a few hundred meters and that tick population sizes were huge. A small genetic heterogeneity was found within farms as if the corresponding tick populations were composed of different sub-units or as if sexual pairs took place between genetically related adults. However, the study of paired individuals demonstrated that males and females mate randomly relatively to their genetic relatedness. Meanwhile, the sympatric co-existence of two strains of ticks, one more adapted to cattle and the other to rusa deer, was unveiled. The observation of within-populations genetic heterogeneity in rusa deer ticks too confirmed that the on-going divergence between host-races is not completed yet.

Our population genetics survey suggested that tick-control in bovine herds failed to promote local extinctions. This information was completed by investigating the diversity in the tick mortality responses towards a long-used (deltamethrin) and a recently-used (amitraz) acaricides. We revealed an ubiquity of deltamethrin-resistance genes, even in farms that have abandoned its uses for years, and the apparition of different physiological changes conferring

resistance to amitraz. Obtaining homozygous strains for sensibility and resistance to either acaricide remains a desirable goal to further precise the genetic diversity involved in such adaptations.

These results illustrate the remarkable speed with which this parasite species can evolve.

Résultats

Résultats scientifiques

Mise au point de marqueurs codominants polymorphes

Nous avons cherché à adapter les marqueurs microsatellites publiés pour *R. microplus* (Chigagure *et al.* 2000). Ces marqueurs s'étant avérés inexploitable, nous avons développé nos propres marqueurs. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Koffi *et al.* 2006).

Structure génétique des tiques dans et entre élevages bovins

Ce travail correspond à un sous échantillon de 596 tiques adultes de 30 vaches des huit élevages de la Figure 2. Ces tiques ont été génotypées sur les huit loci exploitables décrits dans Koffi *et al.* (2006). Aucun déséquilibre de liaison n'a pu être mis en évidence pour chacune des paires de loci testées, suggérant une information indépendante donnée par chaque locus. L'analyse des distributions d'allèles intra-individuelles, inter-individuelles et inter-élevages a imposé l'exclusion de deux loci au comportement particulier. Les six loci restants ont permis de déterminer un certain nombre de caractéristiques inédites et surprenantes de la biologie de *R. microplus*. Tout d'abord aucun effet ponte/cycle n'est observé. Le déficit en hétérozygotes intra-échantillon reste en effet faible (entre 0.03 et 0.07 par rapport à une rencontre au hasard des gamètes) que l'on considère les tiques de chaque individu hôte comme une population ou l'ensemble des tiques de l'élevage. Ces déficits ne peuvent être expliqués par des causes techniques comme les allèles nuls. Par ailleurs la distribution des fréquences alléliques entre fermes reflète un isolement par la distance très significatif (méthode de Rousset, 1997, P -value = 0.0002). En utilisant les données disponibles (Bianchi & Barré 2003) nous parvenons à une estimation grossière de quelques centaines de tiques reproductrices par km² et une dispersion efficace de l'ordre de quelques centaines de mètres par génération de tique (trois mois environ). Ce travail a fait l'objet de la rédaction d'un article soumis pour publication (Koffi *et al.* soumis).

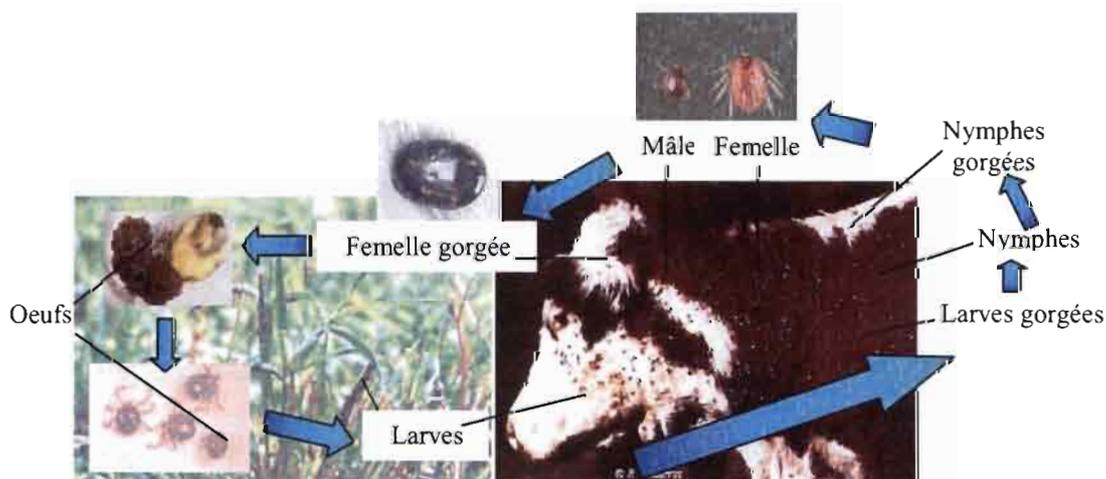


Figure 1. Cycle biologique de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. L'ensemble des stades (larve, nymphe et adulte) se nourrissent sur le même individu hôte.

Nous avons utilisé l'indice de Wang (2002) pour mesurer l'apparementement entre individus mâles et femelles. Ceci permet de montrer que les couples se forment au hasard : aucune corrélation n'est mise en évidence entre le statut accouplé ou non-accouplé et l'apparementement des tiques femelles avec les tiques mâles, et ce quel que soit le niveau populationnel considéré (couples dans chaque individus hôte ou couples dans chaque ferme). L'appariement des adultes n'explique donc pas l'hétérogénéité locale observée (déficits locaux d'hétérozygotes). Cette hétérogénéité pourrait provenir d'un effet Wahlund dû à la coexistence de plusieurs stocks de tiques. Ce travail fait l'objet de la rédaction d'un article à soumettre (Chevillon *et al.* en préparation).

Structure génétique des tiques entre bovins et cerfs

La non-pertinence du niveau "individu hôte" a été vérifiée là où plusieurs cerfs arboraient plus d'une dizaine de tiques. Dès lors, ce niveau n'a plus été pris en compte. Notons que chez les cerfs beaucoup de larves et de nymphes ont été prélevées et génotypées afin de parvenir à des effectifs acceptables (Figure 2). En utilisant une procédure hiérarchique nous trouvons une différenciation entre tiques de cerfs et de bovins (dans chaque ferme) faible mais très significative ($F_{\text{bovin-cerf/ferme}} = 0.008$, P -value $< 10^{-4}$). Il est remarquable que cette différenciation s'accompagne d'une structuration génétique des tiques de cerfs rigoureusement identique à celle trouvée chez les bovins, avec un déficit local d'hétérozygotes de $F_{is} = 0.05$ et une faible différenciation génétique entre fermes ($F_{st} = 0.02$), les deux étant très significatifs (P -value < 0.002) au sein de chaque espèce-hôte. On retrouve chez les cerfs un isolement par la distance significatif (P -value = 0.024) et du même ordre de grandeur que celui trouvé chez les bovins.

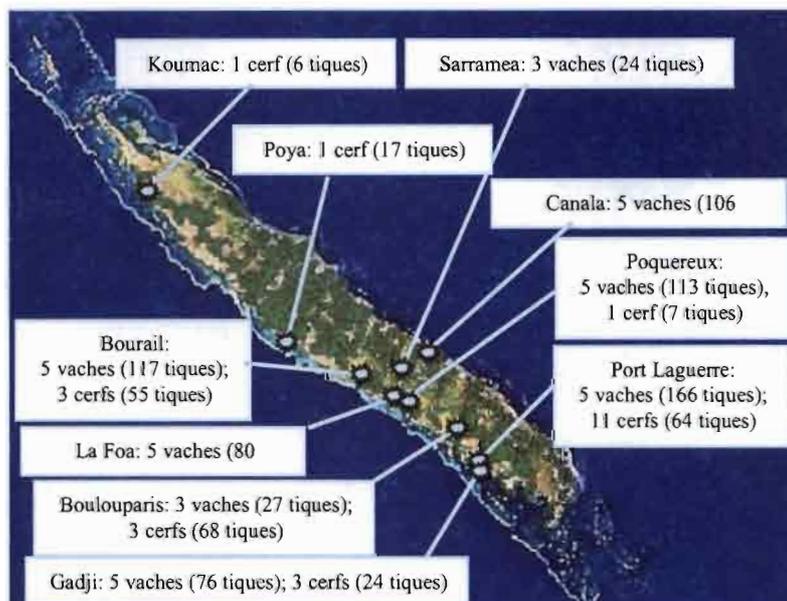


Figure 2. Sites d'échantillonnages de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, avec les espèces hôtes, le nombre d'individus hôtes et le nombre de tiques échantillonnées.

Evolution de la résistance aux acaricides

Deux souches de tiques sont en cours de sélection à l'IAC dans le but d'obtenir des souches homozygotes de référence pour la susceptibilité et la résistance aux deux acaricides utilisés. La souche *TQUOTINE* a été créée à partir des pontes de deux femelles collectées en 2003 dans une ferme dont les tiques étaient sensibles à la deltaméthrine, et qui n'avait encore jamais utilisé l'amitraz. La souche *VACHE3* a été créée en 2003 à partir de tiques de Gadji, une ferme dont les tiques avaient depuis longtemps cessé d'être sensibles à la deltaméthrine et où venait d'apparaître le premier cas de résistance à l'amitraz (Ducornez *et al.* 2005). En avril 2005, des

femelles gorgées ont été prélevées dans 36 fermes provenant des régions ouest et nord de l'île. La mortalité de leurs descendants vis-à-vis des 2 acaricides a été analysée selon le protocole de Ducornez *et al.* (2005), et comparée à celles des souches *TIQUOTINE* et *VACHE3*. Ces tests ont été répliqués en présence de l'un ou l'autre de trois synergistes: TPP (triphenylphosphate), PB (pyperonyl butoxide) et ME (diethyl maleate), inhibant respectivement les activités de trois familles d'enzymes susceptibles d'être impliquées : les esterase (TPP), P450 oxydases (PB) et glutathion-S-transferases (ME). L'ajustement des modèles linéaires log-probit aux données de mortalité et la comparaison des taux de résistance s'est faite classiquement au travers des estimations de ratios RR de résistance à 50%, 90% et 95% (Robertson and Preisler, 1992). L'effet d'un synergiste a été estimé par le changement de RR induit par le synergiste.

Nous avons montré que la résistance à la deltaméthrine persistait partout où ce produit a été abandonné, sans jamais y être fixé. Malheureusement, l'hétérogénéité de mortalité au sein des souches *TIQUOTINE* et *VACHE3* ne nous ont pas fourni les références nécessaires à la caractérisation de la diversité des mécanismes physiologiques impliqués. *TIQUOTINE* s'est aussi avérée une mauvaise référence de la susceptibilité à l'amitraz (rejet du modèle log-linéaire, P -value = 0.004). Toutefois, ici, nous avons pu lui substituer une population de tiques du nord de l'île pour lequel l'ajustement log-linéaire était accepté ($P > 0.1$). *TIQUOTINE* fournit alors des estimations de RR compris entre 1 and 2.5, permettant donc de considérer qu'une véritable résistance se caractérise par $RR > 2.5$. Ce critère permet d'identifier la présence, non fixée, de résistance à l'amitraz dans 10 fermes (Figure 3). La variabilité des impacts des synergistes sur les résistance ratios obtenus pour ces 10 échantillons résistants a révélé la co-existence d'au moins deux mécanismes différents. Un article décrivant ces résultats sur la résistance aux acaricides est en cours de rédaction.

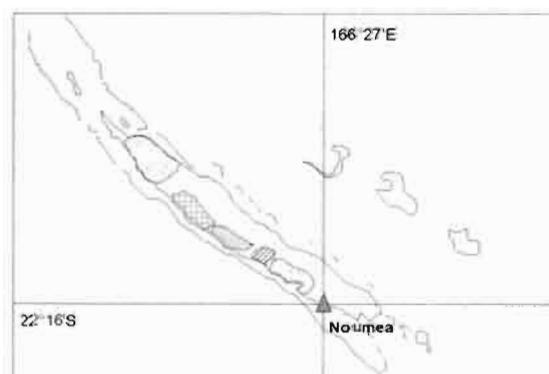


Figure 3. Zones échantillonnées pour les tests de résistance aux acaricides avec le nombre d'échantillons prélevés et entre parenthèses le nombre d'échantillons résistants à l'Amitraz.

Actions de transfert

Un premier acquis, crucial pour toute future gestion de la diffusion de résistances acaricides dans l'île, tient en la détection et la caractérisation de l'apparition des premières résistances néo-calédoniennes à l'amitraz.

La multiplicité de résistance à l'amitraz détectée est parfaitement cohérente avec nos résultats de structuration génétique. Tous deux concluent que le souci de contrôle démographique de ce parasite invasif n'est pas lié à une forte capacité de dispersion mais à ses grandes populations facilitant la rapidité d'apparition de nouveaux mutants adaptatifs.

Les problèmes techniques que nous avons résolus en ce qui concerne les marqueurs microsatellites seront profitables à nos collègues qui travaillent sur cette espèce d'importance économique majeure en zone tropicale, et qui pourront mettre à profit nos acquis pour étudier

leurs populations invasives. Les méthodologies d'analyses statistiques que nous avons dû utiliser et adapter pour nos travaux ont contribué à une partie d'un article de synthèse sur ces questions (De Meeûs *et al.* soumis). En tout, le projet aura permis la rédaction de six articles, la réalisation d'un poster et d'une communication en congrès international.

Articles parus et soumis

Koffi B.B., Risterucci A.M., Joulia D., Durand P., Barré N., de Meeûs T. & Chevillon C. (2006). Characterization of polymorphic microsatellite loci within a young *Boophilus microplus* metapopulation. *Mol. Ecol. Notes*, 6: 502-504.

Koffi B.B., de Meeûs T., Barré N., Durand P., Arnathau C. & Chevillon C. (Soumis). Between and within herds genetic differentiation in the cattle tick *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*: How much do humans determine the parasite's traits?

De Meeûs T., McCoy K.D., Prugnolle F., Durand P., Chevillon C., Hurtrez-Boussès S. & Renaud F. (Soumis). Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête".

Poster

Koffi B.B., de Meeûs T., Barré N., Ducornez S., de Garine-Wichatitsky M. & Chevillon C. (2004). The cattle tick *Boophilus microplus* in New Caledonia Island: An invasive pathogen developing pesticide-resistance on cattle while colonizing an invasive host-species, *Cervus timorensis russa*. Poster présenté au cours de la conférence *IX European Multicollloquium of Parasitology*, Valencia (Espagne) du 18 au 23 juillet 2004.

Communication orale

Chevillon C., Koffi B.B., Durand P. & de Meeûs T. (2005) Population structure of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*, in New Caledonian island. 5th International Conference on *Ticks and Tick-Borne pathogens*. Neuchâtel, Suisse, 29/08/05-02/09/05.

Recommandations

Les marqueurs microsatellites publiés pour *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Chigagure 2003) se sont avérés inutilisables. Après développement de nos propres marqueurs, le rendement d'extraction d'ADN sur tique unique s'est montré faible et a demandé un temps de mise au point qui a retardé l'acquisition de résultats publiables. L'obtention de souches de tiques résistantes et sensibles reste un problème à résoudre si nous voulons caractériser précisément les mécanismes de résistance des tiques de Nouvelle Calédonie et leur diversité.

Conclusions et perspectives

Malgré les difficultés rencontrées le bilan de nos recherches est globalement très positif. Nous avons en effet pu mettre en évidence que les populations de *R. microplus* de Nouvelle Calédonie conservent de grandes tailles (faibles niveaux de différenciation entre sites) malgré les traitements intenses aux acaricides et des capacités de dispersion relativement faibles. Les pressions de sélections semblent cependant suffisamment fortes pour que nous ayons pu mettre déjà en évidence une différenciation entre tiques de bovins et tiques de cerfs à partir de nos marqueurs a priori neutres (non codants). De concert avec l'évolution des résistances, ceci témoigne d'une dynamique adaptative spectaculaire chez cette espèce parasite.

Les mécanismes et les gènes impliqués dans la résistance aux acaricides apparaissent complexes et nécessiteront d'autres expérimentations. Sachant que les tiques néo-calédoniennes proviennent d'Australie, nous cherchons à monter une collaboration solide avec nos collègues australiens.

Littérature citée

- Bianchi M. & Barré N. (2003). *Vet. Parasitol.*, 112: 325-336.
- Chigagure N.N., Baxter G.D. & Barker S.C. (2000). *Exp Appl Acarol*, 24: 951-6.
- Ducornez S., Barré N., Miller R.J. & De Garine-Wichatitsky M. (2005). *Vet. Parasitol.*, 130: 285–292.
- Koffi B.B., Risterucci A.M., Joulia D., Durand P., Barré N., de Meeûs T. & Chevillon C. (2006). *Mol. Ecol. Notes*, 6: 502-504.
- Koffi B.B., de Meeûs T., Barré N., Durand P., Arnathau C. & Chevillon C. (Soumis). Between and within herds genetic differentiation in the cattle tick *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*: How much do humans determine the parasite's traits?
- Robertson J.L. & Preisler H.K. (1992). *Pesticide Bioassays with Arthropods*. CRC Press.
- Rousset F. (1997). *Genetics*, 145: 1219-1228.
- Wang J. (2002). *Genetics*, 160: 1203-1215.

De Meeûs Thierry (2006)

Invasion de la Nouvelle-Calédonie par la tique du bétail
Boophilus microplus : interactions avec les bovins et le cerf
rusa : conséquences génétiques et écologiques

In : Programme de recherche invasions biologiques : résumé
des principaux résultats. Paris (FRA) ; Toulouse : CNRS ;
Université Paul Sabatier, 201-206

Colloque de Restitution : Programme de Recherche Invasions
Biologiques